

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

① N° de publication : **2 649 321**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

② N° d'enregistrement national : **89 09209**

⑤ Int Cl^a : A 61 K 31/70.

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②② Date de dépôt : 7 juillet 1989.

③③ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 2 du 11 janvier 1991.

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦① Demandeur(s) : *INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE, établissement public. —
FR.*

⑦② Inventeur(s) : Trung Le Doan ; Christine Chavany.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : S.C. Ernest Gutmann-Yves Plasseraud.

⑤④ Compositions à base de dérivés nucléotidiques, leurs procédés de préparation, et leurs utilisations notamment en
tant que compositions pharmaceutiques.

⑤⑦ La présente invention concerne des compositions com-
prenant des composés constitués de dérivés nucléotidiques,
d'intérêt thérapeutique et/ou clinique, codant, le cas échéant,
pour un polypeptide déterminé, ces dérivés étant hydrophiles,
chargés positivement ou négativement, modifiés ou non, et
associés à un dérivé hydrophobe possédant, le cas échéant,
une charge complémentaire de celle des dérivés nucléotidiques
susmentionnés.

L'invention a plus particulièrement pour objet des compo-
sitions pharmaceutiques comprenant des compositions telles que
définies ci-dessus, et leurs utilisations, notamment pour le
traitement de maladies virales, parasitaires ou tumorales.

FR 2 649 321 - A1

5 COMPOSITIONS A BASE DE DERIVES NUCLEOTIDIQUES,
LEURS PROCEDES DE PREPARATION, ET LEURS
UTILISATIONS NOTAMMENT EN TANT QUE COMPOSITIONS
PHARMACEUTIQUES.

10 La présente invention a pour objet des
compositions à base de dérivés nucléotidiques. Elle a
également pour objet les procédés de préparation de ces
compositions, ainsi que leur utilisation, notamment
dans le domaine pharmaceutique.

15 Les nucléosides modifiés encore appelés "pseudo-
nucléosides" sont utilisés depuis plusieurs années avec
succès contre les maladies d'origine virale, dont le
dernier en date l'AZT (3'-azidothymidine) utilisé dans
le traitement des malades atteints du SIDA (Roland K.
ROBINS, Synthetic Antiviral Agents, C and EN (1986)
28-40). Ces composés agissent en tant que terminateurs
20 de chaînes dans les processus d'élongation
(Transcription inverse par exemple). Ces composés ne
sont actifs qu'après transformation dans les cellules
en dérivés triphosphate correspondants. Ce processus
étant l'étape limitante dans le mode d'action de ces
25 médicaments, il est donc préférable de les utiliser
directement sous forme triphosphate.

Malheureusement, la forme triphosphate du
nucléoside franchit très mal la membrane cellulaire, ce
qui n'est pas le cas pour le nucléoside correspondant.

30 D'autres composés de même nature chimique mais
portant un nombre de motifs plus élevé par molécule
comme les oligonucléotides ou les polynucléotides, dont

certains possèdent des propriétés antivirales reconnues.

5 En effet, les dérivés oligonucléotidiques, ont connu un développement considérable ces dix dernières années en raison de leur aptitude à inhiber sélectivement l'expression de gènes (en particulier des gènes de virus, de parasites, et des oncogènes) dont
10 les produits d'expression sont impliqués directement ou indirectement dans le développement d'une maladie déterminée.

15 Il a été montré également que les oligonucléotides de séquences complémentaires de certaines régions du génome du virus du SIDA (virus HIV) sont capables d'inhiber la prolifération de ce virus in vitro (S. AGRAWAL et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1988) 85, 7079-7083).

20 Cependant, l'utilisation de ces dérivés nucléotidiques (de structure naturelle ou modifiée), notamment en culture de cellules ou en application thérapeutique, se heurte au problème, d'une part, de leur grande sensibilité à la dégradation par des enzymes de l'organisme, telles que les nucléases, et,
25 d'autre part, de leur faible pénétration cellulaire.

30 Ces problèmes ont été partiellement résolus par modification chimique du squelette phosphodiester donnant lieu à de nouvelles classes d'oligonucléotides tels que les oligonucléotides phosphonates, phosphotriesters, et phosphorothioates (notamment ceux décrits dans le brevet français n°84.11795 déposé le 25/07/1984, et dans S. AGRAWAL et al, précédemment cité) et encore les oligonucléotides en configuration α

(C. HELENE and N.T. THUONG, Nucleic Acids and Molecular Biology, vol. 2, ed. by F. ECKSTEIN and D.M. J. LILLEY, Springer Verlag, 1988, pp 105-123).

Certains de ces composés ainsi modifiés présentent effectivement une relativement bonne résistance aux nucléases. Cependant, leur pouvoir de pénétration cellulaire reste très faible, notamment pour ceux de ces composés qui sont chargés, tels que par exemple les oligonucléotides en configuration α et les oligonucléotides phosphorothioates.

Enfin, des polynucléotides comme le [poly(I):poly(C)] sont connus pour leur capacité d'induire la production d'interférons (N.B. FINTER in "Interferons and Interferon Inducers", American Elsevier, New York, (1973))

La présente invention a précisément pour but de résoudre à la fois le problème de la sensibilité aux nucléases et de la faible pénétration dans les cellules de ces composés nucléotidiques, qu'ils soient sous forme naturelle ou modifiée.

Il est bien entendu que dans ce qui précède et ce qui suit, l'expression dérivés nucléotidiques, regroupe à la fois les dérivés mononucléotidiques mono, di ou triphosphates, les dérivés oligonucléotidiques et les dérivés polynucléotidiques, qu'ils soient sous forme naturelle ou modifiée.

L'invention concerne des compositions caractérisées en ce qu'elles comprennent des composés constitués de dérivés nucléotidiques d'intérêt thérapeutique et/ou clinique, ces composés étant associés à des vecteurs de transport physiologiquement

acceptables. Ces vecteurs de transport sont susceptibles, d'une part, de protéger lesdits composés de l'action des enzymes de l'organisme et, d'autre part, de permettre la pénétration de ces composés à travers la membrane cellulaire des cellules contenant une (ou plusieurs) séquence d'ADN, ou d'ARN, endogène ou exogène, cette séquence étant directement ou indirectement impliquée dans le processus du développement d'une pathologie déterminée.

Par dérivés nucléotidiques d'intérêt thérapeutique ou clinique entrant dans la constitution des compositions de l'invention, on entend plus particulièrement tout dérivé susceptible soit d'être directement actif contre une maladie déterminée, soit de permettre la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic in vitro de cette maladie.

Parmi ces dérivés nucléotidiques, on distingue en premier lieu les dérivés mononucléotidiques constitués d'un nucléotide naturel ou modifié et comportant dans leur structure un, deux ou trois groupes phosphates.

Les dérivés oligonucléotidiques, dits "antisens" sont susceptibles de reconnaître spécifiquement une séquence d'ADN ou d'ARN (ou séquence cible), représentative d'une pathologie déterminée et/ou directement liée au processus du développement de cette pathologie. Ces dérivés antisens comprennent généralement dans leur structure une séquence complémentaire de la séquence cible.

Ces séquences cibles d'ADN, ou d'ARN, ainsi reconnues, sont soit des séquences endogènes (ou encore naturellement présentes dans le génome humain ou

animal), soit des séquences exogènes (ou encore n'appartenant pas au génome humain ou animal d'origine, mais provenant de l'extérieur, notamment par l'intermédiaire de bactéries, de parasites, ou de virus).

D'une manière générale, les dérivés d'intérêt thérapeutique compris dans les compositions de l'invention se fixent aux séquences sus-mentionnées de manière à inhiber le processus de développement d'une maladie déterminée provoquée lors de l'expression de cette séquence. En d'autres termes, ils sont actifs par "blocage sélectif" de l'expression d'un gène dont le produit d'expression est responsable d'une maladie déterminée.

Par blocage sélectif, on entend aussi bien le blocage d'une séquence impliquée dans l'initiation, la propagation, ou la terminaison de la répllication d'un gène, lors de la transcription d'un, ou de plusieurs gènes, et/ou de la maturation ou de la traduction des ARN messagers correspondants.

Il peut s'agir également d'une action de protection qui rend la séquence "bloquée" inaccessible pour une protéine, une enzyme ou un composé chimique par exemple.

Les dérivés d'intérêt clinique compris dans les compositions de l'invention sont généralement des sondes nucléotidiques susceptibles de s'hybrider spécifiquement dans des conditions déterminées avec des séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques d'un virus, d'une bactérie ou d'un parasite, suite à une infection d'un individu, ou d'un animal, ou encore à une pathologie

issue d'un dérèglement du fonctionnement de certains gènes d'un individu (par exemple tumeurs, pathologies
5 liées à des dérèglements hormonaux et/ou enzymatiques).

D'une manière générale, les dérivés nucléotidiques (comportant généralement de 1 à 50 nucléotides, et de préférence de 12 à 20 nucléotides) ou polynu-
10 cléotidiques en simple et en double brins (comportant généralement de 10^2 à 10^9 nucléotides, et de préférence 500 à 20.000 nucléotides) utilisés dans le cadre de la présente invention, même s'ils comportent certaines modifications, sont de préférence hydrophiles et
15 comportent des charges, plus particulièrement des charges négatives.

Les dérivés nucléotidiques naturels sont plus avantageux à utiliser dans le cadre de la présente invention, compte tenu de leur simplicité d'obtention et de leur faible prix de revient, que les dérivés
20 nucléotidiques modifiés qui risquent, pour certains d'entre eux, de ne pas s'hybrider correctement avec la séquence cible.

A titre d'exemples, de dérivés mononucléotidiques particulièrement intéressants dans le cadre de la
25 présente invention, on peut citer ceux décrits dans l'article de ROBINS et al précédemment cité.

Parmi les oligonucléotides et polynucléotides particulièrement intéressants à utiliser dans cette invention, on citera, notamment ceux à activité
30 antitumorale (notamment par blocage des oncogènes) ou à activité antivirale, ou antiparasitaire, sous forme chargée, tels que décrits dans le brevet français n°

84.11795, et dans l'article d'AGRAWAL et al sus-mentionnés.

5 Les vecteurs de transport sus-mentionnés sont de préférence biocompatibles et biodégradables, hydrophobes et de nature polymérique ou protéique.

10 Parmi les vecteurs de transport préférés entrant dans la constitution des compositions de l'invention, on peut citer les protéines basiques (telles que les histones) et les protéines plasmatiques, notamment les lipoprotéines (telles que les lipoprotéines de faible densité, ou encore LDL), ou encore la sérum-albumine, les anticorps monoclonaux, les hormones.

15 Par leur propriété de reconnaissance d'épitopes très spécifiques situés sur des protéines exprimées à la surface de cellules bien déterminées, les anticorps monoclonaux, ou encore les hormones, constituent des vecteurs particulièrement avantageux pour un transport ciblé de ces dérivés.

20 Outre le fait que les lipoprotéines protègent les dérivés nucléotidiques de l'action des nucléases, elles permettent également un transport ciblé de ces dérivés vers les cellules cibles (notamment vers les cellules de certaines tumeurs) sur lesquels sont exprimés un grand nombre de récepteurs de ces lipoprotéines. Compte tenu de leur caractère non immunogène et de leur grande variété disponible actuellement sur le marché, les lipoprotéines représentent des vecteurs de transport
25 30 très avantageux.

D'autres vecteurs de transport particulièrement préférés de l'invention sont représentés par les particules submicroscopiques à base de polymères. Par

exemple, des nanoparticules faites à base de polymères d'isobutylcyanoacrylate (telles que décrites dans le
5 brevet européen n° 064967 déposé le 23/04/1982), ou encore les microparticules faites à partir de copolymères de l'acide lactique et de l'acide glycolique (G. SPENLEHAUER, M. VERT, J.P. BENOIT, F. CHABOT and M. VEILLARD, J. Control. Release, (1988) 7, 217-229)
10 peuvent être utilisées pour l'application envisagée dans le cadre de la présente invention.

Par nanoparticules, on entend toutes particules du type sus-mentionné et possédant un diamètre moyen de l'ordre d'environ 100 à environ 500 nanomètres. De
15 préférence, les nanoparticules utilisées dans le cadre de la présente invention ont un diamètre moyen de l'ordre de 200 nanomètres.

Ces nanoparticules présentent l'avantage de protéger les dérivés nucléotidiques des effets des
20 nucléases de l'organisme, et favorisent la pénétration de ces dérivés nucléotidiques dans les cellules.

Des compositions particulièrement préférées de l'invention, sont celles contenant à titre de vecteur de transport, des protéines plasmatiques telles que
25 sus-mentionnées, ces protéines étant elles-mêmes encapsulées dans des particules polymériques telles que les nanoparticules définies ci-dessus.

Toutefois, compte tenu de leur caractère hydrophile et de leurs charges, les dérivés nucléotidiques
30 préférés de l'invention, ne peuvent être associés tels quels aux vecteurs de transport essentiellement hydrophobes entrant dans la constitution des compositions selon l'invention.

Or la présente invention fournit précisément des dérivés nucléotidiques hydrophiles et chargés associés de façon stable à des vecteurs de transport hydrophobes.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet des compositions caractérisées en ce qu'elles comprennent des composés constitués de dérivés mononucléotidiques, oligonucléotidiques ou polynucléotidiques d'intérêt thérapeutique et/ou clinique, tels que mentionnés ci-dessus, ces dérivés étant hydrophiles, chargés positivement ou négativement, modifiés ou non, et associés à un dérivé hydrophobe possédant, le cas échéant, une charge complémentaire de celle des dérivés nucléotidiques sus-mentionnés, ces composés étant eux-mêmes associés à des vecteurs de transport biocompatibles, notamment de nature polymérique et/ou protéique tels que définis ci-dessus.

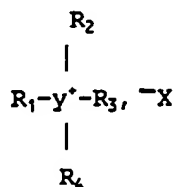
Le dérivé hydrophobe sus-mentionné est avantageusement biocompatible et biodégradable.

Parmi les dérivés hydrophobes, non chargés utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera les dérivés de la porphyrine, de la daunomycine, les lipides etc..., lesquels dérivés hydrophobes sont reliés au dérivé nucléotidique par l'intermédiaire d'une liaison covalente.

Des dérivés hydrophobes particulièrement avantageux, notamment dans le cas où les dérivés nucléotidiques utilisés sont chargés, se présentent sous forme ionique (anionique ou cationique) et possèdent des charges complémentaires de celles des dérivés devant être associés aux vecteurs de transport.

5 Ces dérivés hydrophobes sont capables de se lier d'une part aux dérivés nucléotidiques, par interaction électrostatique avec la charge de ces derniers dérivés, et d'autre part avec les régions hydrophobes du vecteur par leur partie hydrophobe.

10 A titre d'exemple d'ions hydrophobes préférés de l'invention, on citera notamment les cations issus des sels de formule générale



15

dans laquelle

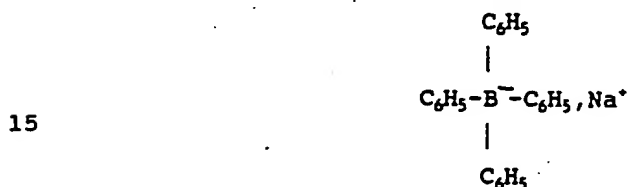
- X représente un halogène, notamment un atome de chlore ou de brome,
- Y représente un atome d'azote ou de phosphore.
- 20 - les groupes R_1 , R_2 , R_3 , et R_4 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, ou une fonction hydroxyle, ou un halogène ou un groupe alcoyle ou alcoxy, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 25 atomes de carbone, le cas échéant substitué par une ou
- 25 plusieurs fonctions hydroxyles, ou un groupe aryle, notamment un groupe phényle ou polyaromatique, pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatomes tels que N, S, P Se, etc...,
- l'un au moins de ces groupes R_1 , R_2 , R_3 , ou R_4 ,
- 30 représente un groupe alcoyle ou aryle tel que défini ci-dessus.

Il va de soi que les sels d'ammonium (dans lesquels Y représente un atome d'azote) ou de

35

phosphonium (dans lesquels Y représente un atome de phosphore) sus-mentionnés sont particulièrement appropriés pour la préparation de compositions de l'invention comprenant des dérivés nucléotidiques chargés négativement.

Dans le cas où les dérivés nucléotidiques sont chargés positivement, on utilisera à titre de dérivé hydrophobe un anion, notamment celui du tétraphénylborure de sodium de formule



D'autres dérivés hydrophobes particulièrement préférés de l'invention sont constitués par des amines à chaîne grasse comportant une charge positive, à pH physiologique, et dont les chaînes hydrocarbonées comprennent notamment de 5 à 25 atomes de carbone, comme par exemple la stéarylamine, la sphingosine, ou encore par les lipides ou les phospholipides, et dont les chaînes hydrocarbonées comprennent notamment de 10 à 25 atomes de carbone comportant également une charge positive dans leur structure.

L'association du dérivé nucléotidique avec un dérivé hydrophobe chargé tel que décrit ci-dessus, se fait avantageusement, par simple mise en contact du dérivé hydrophobe, présentant une charge complémentaire de celle du dérivé nucléotidique, avec ledit dérivé nucléotidique dans des conditions permettant la

formation d'une liaison du type électrostatique entre ces deux dérivés.

5 Cette dernière solution représente une variante préférée du procédé de préparation des compositions de l'invention. En effet, l'établissement d'une simple liaison électrostatique entre le dérivé hydrophobe et le dérivé nucléotidique ne modifie en rien les
10 propriétés structurelles et fonctionnelles de ce dernier, à la différence d'une liaison de covalence qui risque de modifier les propriétés sus-mentionnées et par conséquent d'altérer les effets thérapeutiques et/ou de diagnostic desdits dérivés nucléosidiques ou
15 nucléotidiques.

 Dans le cadre de cette variante préférée du procédé de l'invention, l'étape de mise en contact du dérivé nucléotidique avec le dérivé hydrophobe sous forme ionique, est avantageusement réalisée de manière
20 à ce que le rapport

$$r = \frac{\text{charge du dérivé hydrophobe}}{\text{charge du dérivé nucléotidique,}}$$

25 soit compris entre 1 et 200, de préférence entre 10 et 50.

 L'invention a également pour objet un procédé de préparation de ces compositions comprenant principalement les étapes suivantes :

30 - le cas échéant, la mise en contact du dérivé nucléotidique avec un dérivé hydrophobe, de préférence chargé, lorsque ledit dérivé nucléotidique est

35

- hydrophile et chargé, dans des conditions, telles que décrites ci-dessus, autorisant la formation d'une liaison entre eux, étant entendu que l'expression "liaison" s'entend comme le résultat d'une affinité mutuelle, notamment chimique (par exemple résultant d'un couplage), ou physique (complexation par exemple) ou électrostatique,
- 5 - l'incorporation du composé constitué du dérivé nucléotidique lié, le cas échéant, au dérivé hydrophobe sus-mentionné, dans le vecteur de transport, par interpénétration mutuelle mécanique, notamment par encapsulation, ou encore par adsorption de l'un dans l'autre.
- 10
- 15

Dans le cas de l'utilisation d'un vecteur de transport de nature polymérique, l'étape d'encapsulation du composé constitué du dérivé nucléotidique lié, le cas échéant, au dérivé hydrophobe, dans ce vecteur est réalisée :

20

- soit par mise en présence dudit composé avec les unités monomères du vecteur suivie d'une étape de polymérisation dudit vecteur englobant alors ledit composé,
- 25 - soit au cours même de la polymérisation, c'est-à-dire après le démarrage de la polymérisation mais avant l'achèvement de celle-ci,
- soit par mise en présence dudit composé avec le vecteur sous forme polymérisée, dès lors que l'on peut
- 30 régler les conditions de cette mise en présence de manière à permettre une rétention physique (ou une adsorption) suffisamment forte dudit composé sur le polymère, pour que le composé adsorbé ou retenu sur le

polymère puisse atteindre en même temps que ce dernier les cellules cibles.

5 Des conditions optimales dans lesquelles l'encapsulation dudit composé dans des particules submicroscopiques, notamment dans des nanoparticules d'alkylcyanoacrylate telles que les nanoparticules d'isobutylcyanoacrylate, peut être réalisée, sont plus
10 particulièrement décrites dans le brevet européen 064967 sus-mentionné, ainsi que dans la description détaillée qui suit.

Ainsi, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation d'une composition telle
15 que décrite ci-dessus, qui comprend l'ajout sous agitation, du composé lié, le cas échéant, à un dérivé hydrophobe, à une solution comprenant un polymère du type sus-mentionné, soit sous forme monomère, soit en cours de polymérisation, soit sous forme polymérisée.

20 Il peut être davantage précisé que dans le cadre de l'utilisation des nanoparticules sus-mentionnées, l'étape d'encapsulation desdits composés se fera avantageusement en solution à un pH physiologique voisin de 7, et à des concentrations en NaCl (0,15 M)
25 proches des concentrations salines physiologiques.

L'adsorption desdits composés aux protéines plasmatiques, notamment aux lipoprotéines, se fait avantageusement dans les conditions semblables à celles énoncées ci-dessus.

30 L'invention a également pour objet un procédé de préparation comprenant une étape d'adsorption desdits composés (constitués de dérivés nucléotidiques associés, le cas échéant, à un dérivé hydrophobe), à

des protéines plasmatiques notamment des lipoprotéines,
suivie d'une étape d'encapsulation du complexe
5 précédemment obtenu dans des particules polymériques,
notamment dans des nanoparticules telles que définies
ci-dessus.

L'invention a également pour objet des
compositions pharmaceutiques comprenant au moins une
10 des compositions sus-mentionnées en association avec un
véhicule physiologiquement acceptable.

De telles compositions pharmaceutiques sont plus
particulièrement destinées au traitement de maladies
d'origine virale (notamment du SIDA), bactérienne,
15 parasitaire, ou tumorale ou de toute autre pathologie
liée à une modification du génome d'un individu

Les dosages et les voies d'administration de ces
compositions peuvent varier selon le type d'infection
devant être traitée.

20 Dans le cas le plus général, les compositions
pharmaceutiques de l'invention se présentent sous forme
de préparations injectables en association avec un
liquide pharmaceutiquement acceptable, à pH
physiologique.

25 L'invention a également pour objet une méthode de
transfection cellulaire comprenant la mise en contact
d'une composition selon l'invention comprenant un
dérivé nucléotidique déterminé, notamment un ou
plusieurs gènes déterminés, avec des cellules pour
30 permettre l'internalisation du dérivé nucléotidique
sus-mentionné dans lesdites cellules.

L'invention concerne plus particulièrement une
méthode de transfection telle que définie ci-dessus,

dans laquelle ledit dérivé nucléotidique déterminé comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide déterminé, et, le cas échéant, des éléments de régulation permettant l'expression de ce fragment d'acide nucléique dans la cellule hôte, notamment un promoteur reconnu par les polymérases de ladite cellule hôte. L'obtention du polypeptide déterminé se fait par mise en culture des cellules hôtes transformées dans un milieu de culture approprié, suivie de la récupération du polypeptide déterminé à partir de ces cellules ou du milieu de culture.

Ainsi, l'invention a pour objet des compositions telles que décrites ci-dessus dans lesquelles le dérivé nucléotidique associé au vecteur de transport, et, le cas échéant, à un dérivé hydrophobe, code pour un polypeptide déterminé.

L'invention a plus particulièrement pour objet des compositions du type sus-mentionné dans lesquelles le dérivé nucléotidique déterminé est inséré dans la séquence nucléotidique d'un vecteur de gènes, notamment d'un plasmide, ce plasmide étant lui-même associé à un dérivé hydrophobe sus-mentionné, l'ensemble constitué par ce plasmide associé au dérivé hydrophobe, étant lui-même associé à un vecteur de transport tel que décrit ci-dessus.

Ce dérivé nucléotidique compris dans ce plasmide peut également posséder une structure nucléotidique telle qu'elle permette le blocage de la synthèse d'une protéine déterminée. Dans ce cas, une telle composition est particulièrement avantageuse, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, pour le

traitement de pathologies liées à la synthèse d'une (ou plusieurs) protéine déterminée indésirable.

5 D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore aux cours de la description qui suit d'exemple d'obtention de compositions de l'invention. Il va de soi que ces exemples revêtent aucun caractère limitatif.

10 I - ASSOCIATION OLIGONUCLEOTIDES-NANOPARTICULES

Expérience standard :

Dans 1 ml de milieu de polymérisation contenant 1% de Dextran 70 et la quantité nécessaire de HCl pour que le pH du milieu soit égal à 3, on ajoute 10 μ l de
15 monomère IsoButyl CyanoAcrylate (IBCA) sous agitation magnétique énergique pour disperser le monomère. Au bout de 10 à 15 minutes où la polymérisation se traduit par une opalescence du milieu, on ajoute la solution éthanolique (80 μ l à 200 μ l) contenant le complexe
20 entre le mono ou oligonucléotide et l'ion hydrophobe, étudié dans des proportions définies par r, r étant égal au rapport des charges positives aux charges négatives de l'oligonucléotide. On laisse le mélange en contact avec les nanoparticules en cours de formation
25 pendant 45 minutes sous agitation. On neutralise ensuite le milieu avec 7 μ l de tampon phosphate 1 M ajusté à pH 7, puis on ajoute 30 μ l de NaCl 5 M pour ajuster la concentration ionique du milieu à 0.15 M NaCl. On laisse tourner 30 minutes pour équilibrer le
30 mélange et on centrifuge la solution à 35000 g à 10°C. L'oligonucléotide étant marqué à une extrémité par le phosphore 32, la mesure de la radioactivité du

urnageant S et du culot C permet de déterminer le taux d'encapsulation $r = 100 (C/C + S)$.

5 Les ions hydrophobes utilisés dans les essais qui suivent sont représentés sur les tableaux 1 à 3 suivants :

TABLEAU 1

10	: Code :	Formule	: Composé
	: ST :	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{NH}_3^+$: Stearylamine (1-amino-octadécane)
	: :	:	:
15	: SP :	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CHOH}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$: DL-Dihydro-sphingosine
	: :		: sine
	: :	NH_3^+	: (DL-1,3dihydroxy-2-amino-octadécane)
	: :	:	:

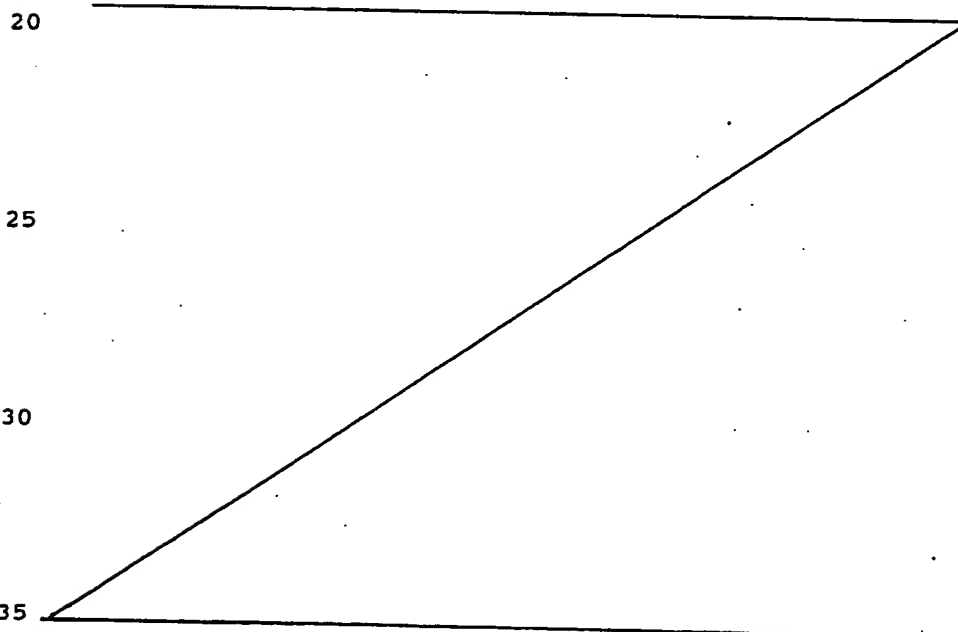


Tableau 2

	$\begin{array}{c} R_2 \\ \\ R_1 - N^+ - R_3 - X \\ \\ R_4 \end{array}$			
Code	R ₁	R ₂ , R ₃ , R ₄	X	COMPOSE
A1	CH ₃	CH ₃	Cl	Tétraméthylammonium, chlorure
A2	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	Cl	Tétra-butylammonium, chlorure
A3	n-C ₆ H ₁₃	n-C ₆ H ₁₃	Cl	Tétra-hexylammonium, chlorure
A4	n-C ₈ H ₁₇	n-C ₈ H ₁₇	Cl	Tétra-octylammonium, chlorure
A5	n-C ₁₆ H ₃₃	CH ₃	Br	Hexadécyltriméthylammonium, bromure (CTAB)

Tableau 1

	$\begin{array}{c} R_2 \\ \\ R_1 - P^+ - R_3 \\ \\ R_4 \end{array} \quad X^-$		
Code	R ₁	R ₂ , R ₃ , R ₄	X
P1	CH ₃	CH ₃	Cl
P2	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	Cl
P3	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	Cl
P4	n-C ₁₆ H ₃₃	n-C ₄ H ₉	Br
			COMPOSE
			Tétraméthylphosphonium, chlorure
			Tétra-butylphosphonium, chlorure
			Tétra-phénylphosphonium, chlorure
			Hexadécyltributylphosphonium, bromure (CTPB)

A) Encapsulation de l'adénosine triphosphate

5 Les essais d'encapsulation de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) ou du dideoxyadénosine 5'-triphosphate (dd-ATP) en présence d'amines à longue chaîne comme la stéarylamine ou la sphingosine a permis d'atteindre des taux d'encapsulation importants (Tableau 4). Dans ces expériences, le marqueur utilisé est le dérivé radioactif marqué au phosphore-32 correspondant.

TABLEAU 4

15	N° expérience :	Cation :	XTP ^(a) :	r	r %
	:	:	:	:	:
	1	:	ATP	200	55
	:	:Stearylamine:	:	:	:
20	2	:	dd-ATP	200	46
	:	:	:	:	:
	:	:	:	:	:
	3	:	ATP	200	73
25	:	:Sphingosine :	:	:	:
	4	:	dd-ATP	200	77
	:	:	:	:	:

(a) : La concentration en XTP est maintenue constante et égale à $1,50 \times 10^{-5}$ M en phosphate et celle du cation à 3×10^{-3} M d'où $r = 200$.

B) Encapsulation d'oligonucléotides

1. Octathymidylate : p(dT)₈

La concentration en $p(dT)_8$ est maintenue constante et égale à $1,5 \times 10^{-5}$ M en phosphate ou $1,9 \mu M$ en oligonucléotide. Dans les expériences qui suivent, l'oligonucléotide est marqué au ^{32}P à l'extrémité 5' et purifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les variations des taux d'encapsulation du cation P_3 (cf tableau 3) marqué au carbone ^{14}C et du $p(dT)_8$ (marqué au ^{32}P) (méthode de double marquage) en fonction de la concentration en P_3 sont présentées sur la figure 1. Dans cette figure, les valeurs de r représentent celles obtenues sans rajout de NaCl en fin de polymérisation. Les valeurs de r présentées dans les autres tableaux et figures sont obtenues en présence de 0,15 M NaCl final. Dans le Tableau 5, les résultats montrent que dans de nombreux cas, on peut encapsuler l'oligonucléotide à plus de 90 %, tout en évitant le phénomène de floculation des nanoparticules.

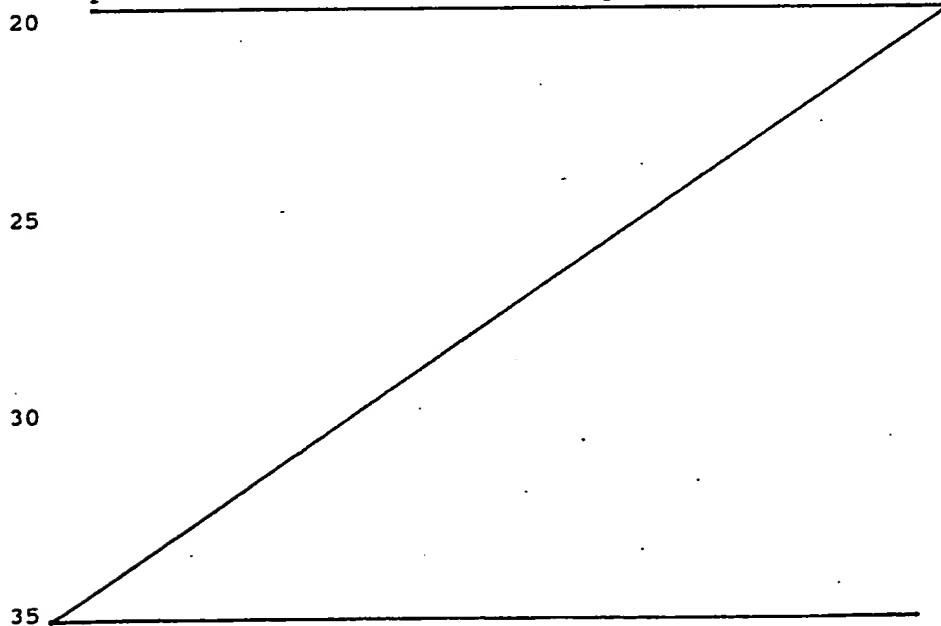


TABLEAU 5

5	N° d'expérience	Cation	r	r(%)
10	5	:	: 200	: 98 ^f
		:Tetraoctyl N°(A4)	:	:
	6	:	: 50	: 31,3
15	7	:	: 200	: 90
		: CTAB (A5)	:	:
	8	:	: 50	: 66
20	9	:	: 200	: 68,4
		:Tétraphényle P°(P3):	:	:
	10	:	: 50	: 41,6
25	11	:	: 200	: 78,5 ^f
		: CTPB(P4)	:	:
	12	:	: 50	: 31,6
30	13	:	: 200	: 95 ^f
		: Stearylamine (ST)	:	:
	14	:	: 50	: 51,5
35	15	:	: 200	: 96,8
	16	: Sphingosine (SP)	: 50	: 88
	17	:	: 20	: 41,6

f : Observation d'aggrégation des nanoparticules ou

floculation aux rapports r élevés en cation hydrophobe.

5

2. Hexadecathymidylates p(dT)₁₆

Dans ces expériences, la concentration en oligonucléotide est égale à $1,84 \mu\text{M}$ ou $2,94 \times 10^{-5}$ en phosphate. Les résultats présentés dans le Tableau 6 montrent que les cations comportant une longue chaîne hydrocarbonée permettent d'atteindre des taux d'encapsulation élevés ($> 95 \%$) pour des rapport r relativement faibles ($r = 20$). De plus, l'utilisation de faibles concentrations de cation permettent de réaliser des suspensions stables de nanoparticules sauf dans le cas du DOTMA. L'évolution du taux d'encapsulation (τ) en fonction du rapport r (nombre de cations par phosphate) est présenté sur la figure 2 pour les 3 cations A5, ST et SP.

20

25

30

35

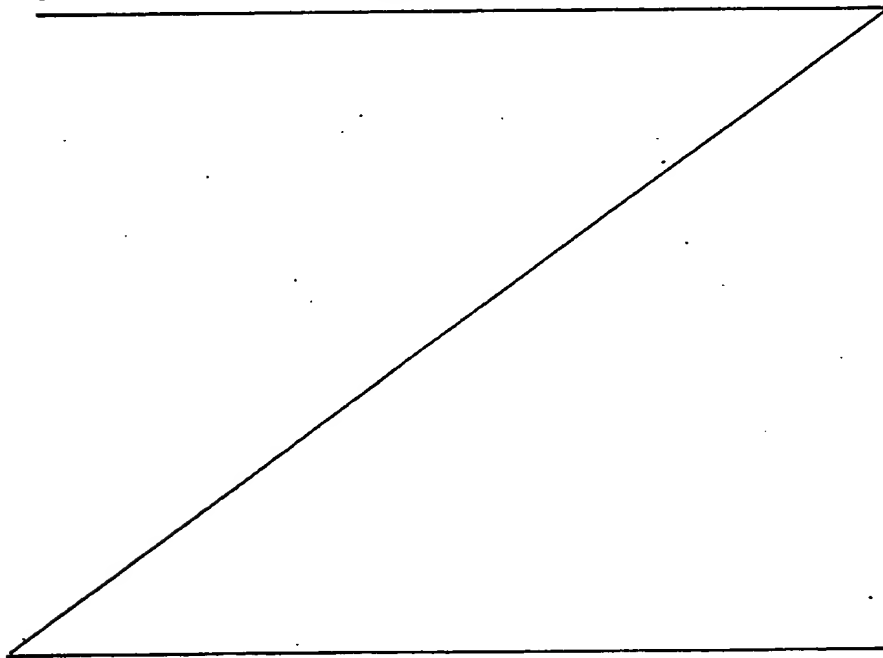


TABLEAU 6

5					
	N° d'expérience	:	Cation	:	r : r(%)
	18	:	Tétraoctyl N° (14)	:	20 : 61,4
10	19	:	CTAB (15)	:	20 : 98
	20	:	CTPB (P4)	:	20 : 96,7
15	21	:	Stearylamine (ST)	:	20 : 96
	22	:	Sphingosine (SP)	:	20 : 97,5
	23	:	DOTMA ^a	:	7 : 69,5 ^f

20 a: N-[1(2,3,-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium, chlorure.

f : floculation.

25 3. Encapsulation en présence de sphingosine (SP) de quelques oligonucléotides de séquence connue dont un oligophosphorothioate

Les résultats sont indiqués sur le tableau 7 suivant.

La concentration en oligonucléotide utilisée est de 0,102 μ M en oligonucléotide.

30

35

TABLEAU 7

5					
	N° d'expérience	:	Cation	:	r : r(%)
10	24	:	5'-ATAGTACAGAAA-3'	:	50: 49
		:	(PO)	:	:
	25	:	5'-ATAGTACAGAAA-3'	:	50: 81,2
		:	(PS) ^a	:	:
15	26	:	P(dT) ₁₆	:	50: 30,9
	27	:	5'TCCTGATAAAGGA-	:	50: 36,2
		:	GGAGATGAAG-	:	:
		:	AAAAAATGA-3'	:	:
20					

a : oligophosphorothioate dans lequel un atome d'oxygène non pontant est remplacé par un atome de soufre.

25 Ces expériences montrent qu'à longueur et séquence identiques, un oligophosphorothioate s'encapsule mieux que le composé phosphodiester correspondant. En comparant les expériences n° 26 et 22, on peut voir que l'efficacité d'encapsulation est
30 directement reliée à la concentration du complexe cation-oligonucléotide présent dans le milieu de polymérisation.

4) Encapsulation directe de quelques oligonucléotides modifiés.

5 Dans les expériences suivantes, sont indiqués
les résultats d'encapsulation directe (absence de
cations hydrophobes) de quelques oligonucléotides au
bout desquels sont accrochés de manière covalente des
groupements chimiques divers (cf. Tableau 8) : chaîne
10 hydrocarbonée, intercalant (dérivés de l'acridine),
drogue (daunomycine), photosensibilisateur
(porphyrine). La structure de ces composés est montrée
sur la figure 3. La présence de ces groupements peut
conférer à la molécule hybride un caractère hydrophobe
15 accru qui se reflète dans leur taux d'encapsulation
dans les nanoparticules ainsi que dans leur pouvoir
d'association avec les lipoprotéines (voir plus loin).

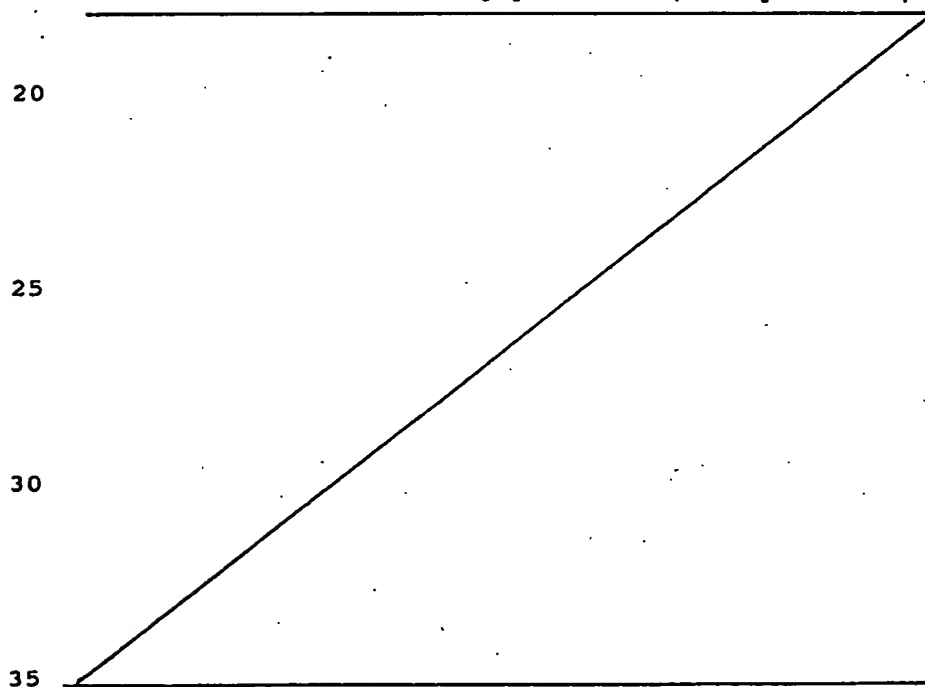


TABLEAU 8

5	N° d'expérience : oligonucléotide (ON) : [ON] : τ (%)			
	:	:	:	:
	28	:	p(dT) ₈	: 0,5 μ M : 3
10	:	29	:	T ₈ -(CH ₂) ₅ -Acridine : 0,5 μ M : 5
	:	30	:	T ₇ (CH ₂) ₅ -Porphyrine : 0,5 μ M : 98
15	:	31	:	5'-TTTTCTCTCTCT-dauno- : :
			:	mycine : 2 μ M : 79
	:	32	:	5'-AGCCACACC-(CH ₂) ₁₁ - : :
	:		:	CH ₃ : 12 μ M : 3

20 Dans les expériences n° 29, 30 et 31, l'encapsulation est suivie par mesures fluorimétriques. Il a été vérifié que les propriétés d'émission des fluorophores n'étaient pas affectées par la présence du polymère.

25 c) Encapsulation de polynucléotides

30 Dans les exemples suivants, il apparaît nettement que les nanoparticules de poly(isobutylcyanoacrylate) peuvent encapsuler des polynucléotides en simple brin qu'ils soient constitués de motifs en structure ribo-(polyU) ou désoxyribonucléotide comme le poly(dT) (cf. Tableau 9). L'exemple des structures en double brin est illustré par le DNA de thymus de veau (non soniqué) (expérience n° 36 et 37).

35

TABLEAU 9

5	N° expérience :	Cation :	PolyN :	r :	r(%)
	:	:	:	:	:
	33	Sphingosine	poly(dT)	3	28
		(sp)			
10	-----	-----	-----	-----	-----
	34	Tétraoctyl N°	polyU	10	52
		(A4)			
	35	CTAB (A5)	polyU	20	54
15	-----	-----	-----	-----	-----
	36	CTAB (A5)	DNA	50	76
	-----	-----	-----	-----	-----
	37	Sphingosine	DNA	50	.96
		(SP)			
20	-----	-----	-----	-----	-----

La concentration du polynucléotide est égale à 4×10^{-5} M en phosphate. Ces expériences montrent qu'il est possible d'utiliser ces vecteurs de polymère pour encapsuler des ARN messagers ou du DNA d'organismes supérieurs dont une molécule peut contenir plusieurs milliards de paires de bases.

II Association oligonucléotides-lipoprotéines.

Des lipoprotéines représentées dans cet exemple par la fraction de basse densité, fraction LDL, peuvent fixer des oligonucléotides lorsque ceux-ci portent un groupement hydrophobe comme la porphyrine (figure 4). Les résultats montrent qu'une molécule de LDL par exemple peut fixer jusqu'à 17 molécules d'un

oligoheptathymidylate couplé à une porphyrine (T7-POR). Dans une expérience de contrôle dans les mêmes conditions, un oligonucléotide non couplé (pdT16) n'est pas encapsulé.

L'utilisation de vecteurs comme le LDL pourrait permettre de cibler les oligonucléotides vers certains types de cellules tumorales où les récepteurs de LDL sont exprimés en plus grand nombre que les cellules parentes non transformées.

Les légendes des figures mentionnées ci-dessus sont les suivantes :

- figure 1 : encapsulation de P_3 (\square) et de $p(dT)_8$ (O) en fonction de la concentration en P_3 . La concentration en oligonucléotides est gardée constante et égale à $1,6 \times 10^{-6}$ M en phosphate, et celle des nanoparticules (NP) à 8 mg/ml. Le pH du milieu de polymérisation est ajusté à 7 après 1 heure de polymérisation par addition de 7 μ l de tampon phosphate de sodium (1 M). Dans cette expérience, il n'y a pas d'addition de NaCl en fin de polymérisation.

- figure 2: encapsulation de $p(dT)_{16}$ ($2,94 \times 10^{-5}$ M en phosphate) en présence de sphingosine (\blacklozenge), stearylamine (\square) ou CTAB (\blacktriangle) par des nanoparticules d'IBCA (10 mg/ml). Le pH du milieu de polymérisation est ajusté à 7 puis équilibré avec NaCl (0,15 M final) en fin de polymérisation.

- figure 4 : courbe de fixation de l'oligonucléotide T7-POR sur les LDL (plasma humain) déterminée par mesure de la fluorescence de la porphyrine à 626 nm. La concentration en oligonucléotide est égale à 3,5 μ M. La

stoéchiométrie du complexe est estimée égale à 17
molécules d'oligonucléotide fixées par molécule de LDL.

5

10

15

20

25

30

35

REVENDEICATIONS

5 1. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend
des composés constitués de dérivés nucléotidiques,
d'intérêt thérapeutique et/ou clinique, codant, le cas
échéant, pour un polypeptide déterminé, ces dérivés
étant hydrophiles, chargés positivement ou
10 négativement, modifiés ou non, et associés à un dérivé
hydrophobe possédant, le cas échéant, une charge
complémentaire de celle des dérivés nucléotidiques
sus-mentionnés.

2. Composition selon la revendication 1,
15 caractérisée en ce que les dérivés nucléotidiques sont
constitués d'une séquence nucléotidique insérée dans la
séquence d'un vecteur, notamment d'un plasmide.

3. Composition selon la revendication 1 ou la
revendication 2, caractérisée en ce que le dérivé
hydrophobe n'est pas chargé, et est notamment un dérivé
20 du type porphyrine, ou daunomycine.

4. Composition selon la revendication 1 ou la
revendication 2, caractérisée en ce que le dérivé
hydrophobe est chargé et se présente sous forme
cationique ou anionique.
25

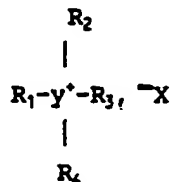
5. Composition selon la revendication 4,
caractérisée en ce que le rapport
charge du dérivé hydrophobe

$r =$

30 charge du dérivé nucléotidique,
est compris entre 1 et 200, de préférence entre 10 et
50.

35

6. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le dérivé hydrophobe correspond au cation issu du composé de formule générale :



dans laquelle :

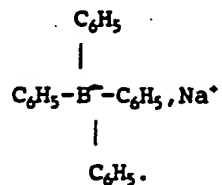
- X représente un halogène, notamment un atome de chlore ou de brome,

- Y représente un atome d'azote ou de phosphore,

- les groupes R_1 , R_2 , R_3 , et R_4 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, ou une fonction hydroxyle, ou un halogène, ou un groupe alcoyle ou alcoxy, linéaire ou ramifié ayant de 1 à 25 atomes de carbone, ou un groupe aryle, notamment un groupe phényle, ou polyaromatique pouvant contenir un ou plusieurs hétéroatomes tels que N, S, P, Se,

- l'un au moins de ces groupes R_1 , R_2 , R_3 , ou R_4 , représente un groupe alcoyle ou aryle tel que défini ci-dessus.

7. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le dérivé hydrophobe correspond à l'anion issu du tétraphénylborure de sodium de formule



5 8. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les vecteurs de transport sont constitués de nanoparticules à base de polymère, notamment d'un polymère d'alkylcyanoacrylate, ou d'un polymère à base d'acide lactique et d'acide glycolique.

10 9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que les vecteurs de transport sont constitués de protéines plasmatiques, notamment des lipoprotéines de faible densité (LDL).

15 10. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les vecteurs de transport sont constitués de protéines plasmatiques, notamment des lipoprotéines de faible densité (LDL), elles-mêmes encapsulées dans des nanoparticules telles que définies dans la
20 revendication 8.

11. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

25 12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est plus particulièrement appropriée au traitement de maladies d'origine virale, bactérienne, parasitaire ou tumorale.

30 13. Méthode de transfection cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en contact d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 avec des cellules hôtes, dans des conditions permettant l'internalisation du dérivé

2649321

35

nucléotidique compris dans ladite composition à
l'intérieur desdites cellules hôtes.

5

10

15

20

25

30

35

1/4

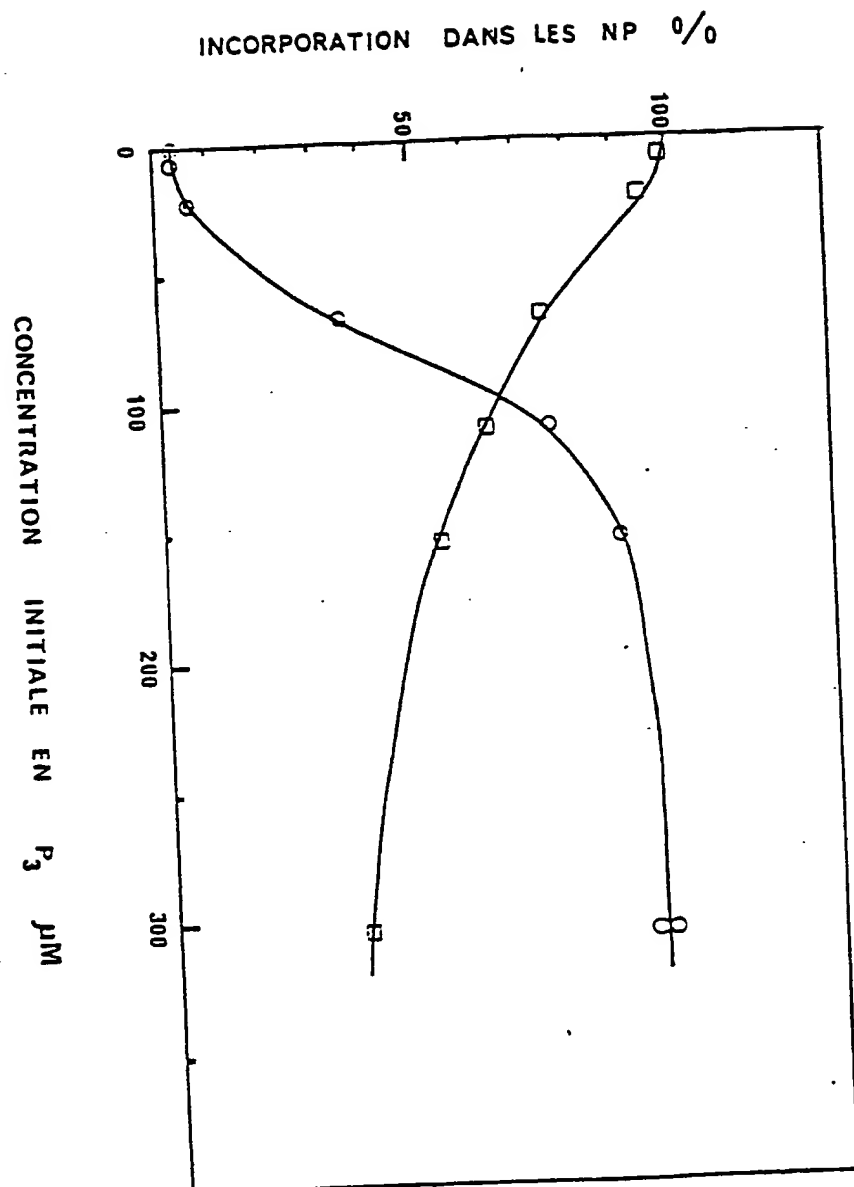


Figure 1

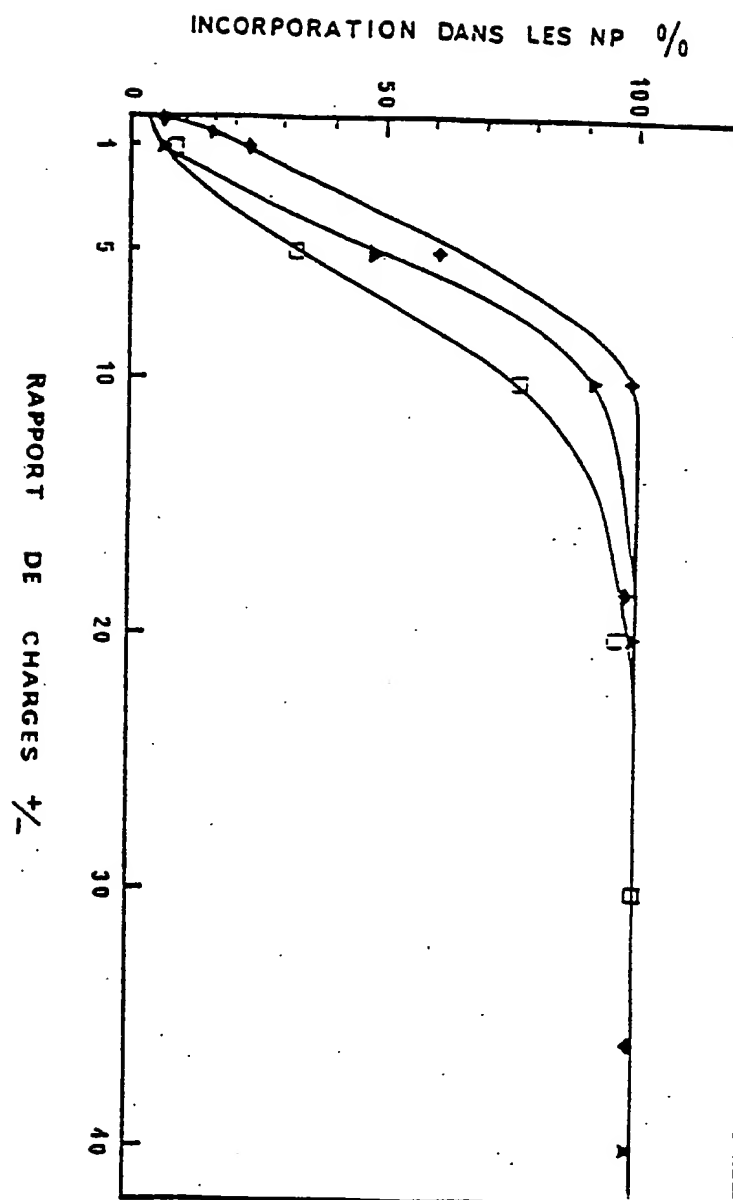
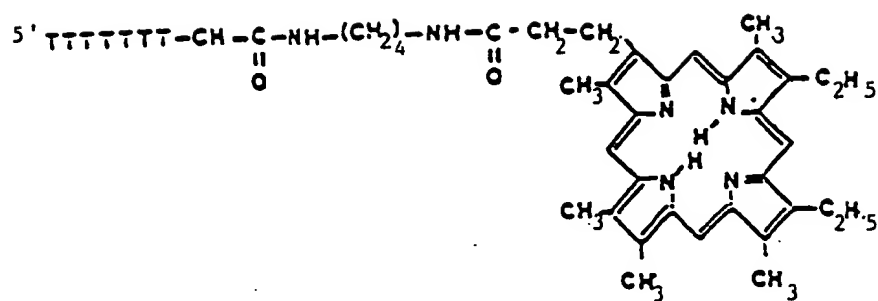


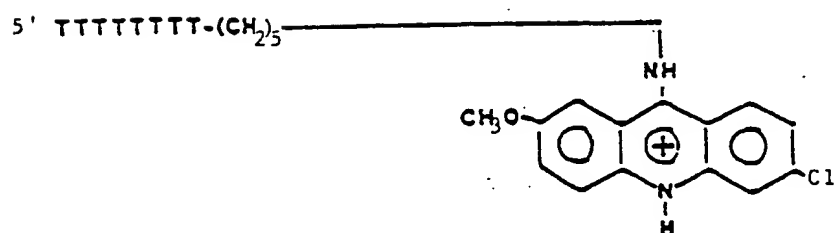
Figure 2

2649321

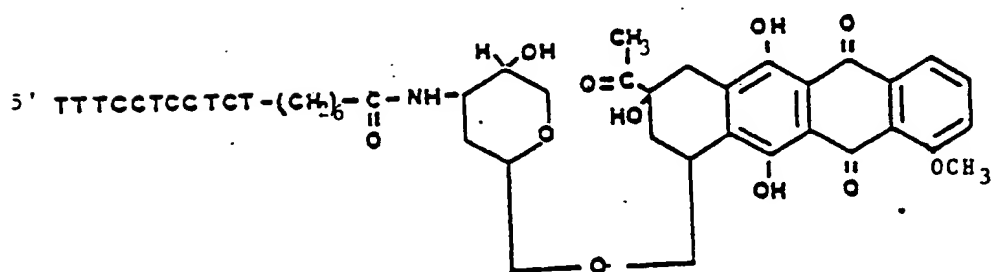
3/4



methylpyrroperphyrine XXI



2-methoxy, 6-chloro, 9-amine acridine



daunomycin

Figure 3

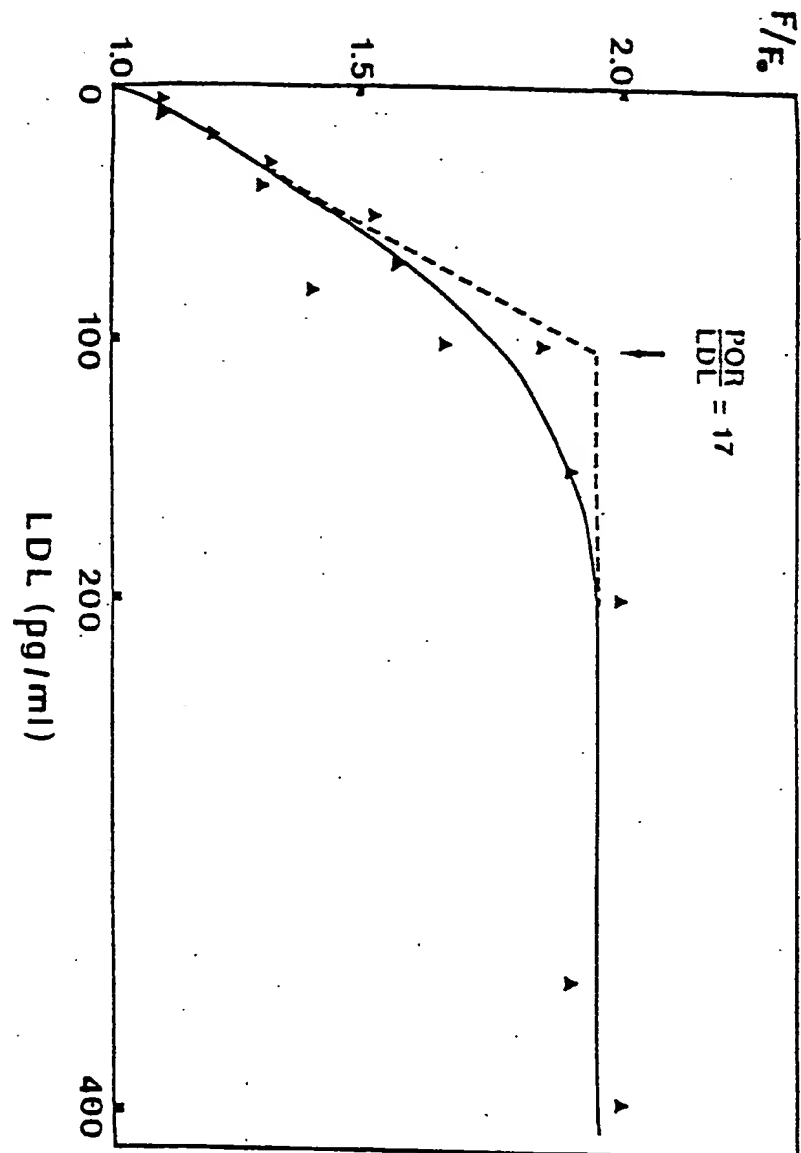


Figure 4

PTO 02-2411

French Patent No. 2 649 321

COMPOSITIONS BASED ON NUCLEOTIDE DERIVATIVES, PROCESSES FOR THEIR
PREPARATION, AND THEIR USE PARTICULARLY AS PHARMACEUTICAL
COMPOSITIONS

Trung Le Doan and Christine Chavany

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. APRIL 2002

TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

REPUBLIC OF FRANCE
NATIONAL INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROPERTY
PARIS

Patent No. 2 649 321 A1

National registration No:	89 09209
International Classification:	A 61 K 31/70
Filing Date:	July 7, 1989
Date of Public Access to Application:	BOPI "Patents" no. 2 of January 11, 1991

COMPOSITIONS BASED ON NUCLEOTIDE DERIVATIVES, PROCESSES FOR THEIR
PREPARATION, AND THEIR USES PARTICULARLY AS PHARMACEUTICAL
COMPOSITIONS.

Applicant:	NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH AND MEDICAL RESEARCH
Inventor:	Trung Le Doan and Christine Chavany

This invention pertains to compositions based on nucleotide derivatives. Its object is also /1*
the processes for preparing these compositions, as well as their use, particularly in the
pharmaceutical field.

Modified nucleosides, also called "pseudonucleosides," have been used successfully for
several years against viral diseases. The most recent is AZT (3'-azidothymidine), used to treat
patients with AIDS (Roland K. ROBINS, Synthetic Antiviral Agents, C and EN (1986), 28 - 40).
These compounds act as chain terminators in the elongation processes (inverse transcription, for
example). These compounds are active only after they are transformed in the cells into the
corresponding triphosphate derivatives. As this process is the limiting stage in the mode of action

* [Editor's note: Numbers in the right margin indicate pagination in the foreign language document.]

of these drugs, it is preferable to use them directly in their triphosphate form.

Unfortunately, the triphosphate form of the nucleoside does not efficiently cross the cell membrane, although the same is not true for the corresponding nucleoside.

There are other compounds of the same chemical nature but having a higher number of motifs per molecule, such as the oligonucleotides or the polynucleotides, some of which have known antiviral properties.

/2

In fact, the oligonucleotide derivatives have undergone considerable development in the last ten years because of their ability to selectively inhibit the expression of genes (particularly genes of viruses, parasites, and oncogenes) whose expression products are directly or indirectly involved in the development of a particular disease.

It has also been shown that the oligonucleotides with complementary sequences of certain regions of the genome of the AIDS virus (HIV) are capable of inhibiting the proliferation of this virus in vitro (S. Agrawal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1988) 85: 7079-7083).

However, the use of these nucleotide derivatives (with natural or modified structure), particularly in a cell culture or in therapeutic application, comes up against the problem, on the one hand, of their sensitivity to degradation by enzymes, such as nucleases and, on the other hand, their weak cellular penetration.

These problems have been solved in part by a chemical modification of the phosphodiester backbone giving rise to new classes of oligonucleotides such as the phosphonate, phosphotriester, and phosphorothioate oligonucleotides (particularly those described in French Patent No. 84.11795 filed on 7/25/1984, and in S. Agrawal et al, op. cit.) as well as the oligonucleotides in alpha configuration (C. Helene and N. T. Thuong, Nucleic Acids and Molecular Biology, vol. 2, edited by F. Eckstein and D. M. J. Lilley, Springer Verlag, 1988, pp. 105-123).

/3

Some of these modified compounds actually show relatively good resistance to nucleases. However, their cell penetrating power is still low, particularly for those compounds which are charged, such as the oligonucleotides in alpha configuration and the phosphorothioate

oligonucleotides.

Finally, the polynucleotides such as [poly(I):poly(C)] are known for their capacity to induce interferon production (N. B. Finter in Interferons and Interferon Inducers, American Elsevier, New York (1973)).

The purpose of this invention is to solve both the problem of sensitivity to nucleases and the low level of cell penetration of these nucleotide compounds, whether they are in natural or modified form.

In the preceding and the following, it is understood that the term "nucleotide derivatives" includes mono-, di-, or triphosphate mononucleotide derivatives, oligonucleotide derivatives, and polynucleotide derivatives, in natural or modified form.

The invention pertains to compositions characterized in that they comprise compounds made up of nucleotide derivatives or therapeutic and/or clinical interest, these compounds being associated with physiologically acceptable transport vectors. On the one hand, these transport vectors can protect said compounds from the action of the body's enzymes and, on the other hand, they can allow these compounds to penetrate the cell membrane of cells containing one (or more) endogenous or exogenous DNA or RNA sequence, this sequencing being directly or indirectly involved in the development of a particularly pathology.

/4

Reference to nucleotides of therapeutic or clinical interest entering into the makeup of the compositions of the invention covers particularly any derivative that can be active directly against a specific disease, or allow the use of an in vitro diagnostic method for this disease.

First among these nucleotide derivatives are the mononucleotide derivatives made up of a natural or modified nucleotide with a structure that includes one, two, or three phosphate groups.

The oligonucleotide derivatives, called "antisense," can specifically recognize a DNA or RNA sequence (or target sequence) representative of a specific pathology and/or directly connected to the development of this pathology. These antisense derivatives generally include in their structure a sequence complementary to the target sequence.

These target DNA or RNA sequences recognized in this way are either endogenous

sequences (or sequences naturally present in the human or animal genome), or they are exogenous sequences (belonging neither to the original human or animal genome, but introduced from the outside, particularly by means of bacteria, parasites, or viruses). /5

In general, the derivatives of therapeutic interest included in the compositions of the invention attach to the above-mentioned sequences to inhibit the development of a certain disease that occurs when this sequence is expressed. Stated otherwise, they act by "selective blocking" of the expression of a gene whose expression product is responsible for a given disease.

"Selective blocking" means blocking of a sequence involved in the initiation, propagation, or termination of the replication of a gene at the time of transcription of one or more genes, and/or the maturation or translation of the corresponding messenger RNAs.

There may also be a protective action which makes the "blocked" sequence inaccessible for a protein, an enzyme, or a chemical compound, for example.

The derivatives of clinical interest included in the compositions of the invention are generally nucleotide probes that can become hybridized specifically under determined conditions with specific DNA or RNA sequences of a virus, bacteria, or parasite, following infection of an individual or an animal, or resulting from the disordered function of certain genes of an individual (for example, tumors, pathologies connected to hormonal and/or enzymatic imbalances). /6

In general, nucleotide derivatives (generally comprising 1 to 50 nucleotides, and preferably 12 to 20 nucleotides) or single- and double-strand polynucleotide derivatives (generally comprising 10^2 to 10^9 nucleotides, preferably 500 to 20,000 nucleotides) used in this invention, although they include certain modifications, are preferably hydrophilic and carry charges, particularly negative charges.

The natural nucleotide derivatives are readily obtained and are inexpensive, they are more advantageous to use in the context of this invention than modified nucleotide derivatives, some of which present the risk of not hybridizing correctly with the target sequence.

Examples of mononucleotides that are particularly valuable in the context of this invention are those described in the article by ROBINS et al., cited above.

Examples of oligonucleotides and polynucleotides that are particularly useful in this invention are those with antitumor activity (particularly those that block oncogenes) or with antiviral or antiparasite activity, in charged form, such as those described in French Patent No. 84.11795, and in the article by AGRAWAL et al., mentioned above.

/7

The above-mentioned transport vectors are preferably biocompatible and biodegradable, hydrophobic and are polymers or proteins.

Preferred transport vectors used in making the compositions of the invention are basic proteins (such as histones) and plasma proteins, particularly lipoproteins (such as low-density lipoproteins, or LDL) or serum albumin, monoclonal antibodies, and hormones.

Because of their property of recognizing very specific epitopes located on proteins expressed on the surface of specific cells, the monoclonal antibodies or the hormones form particularly advantageous vectors for targeted transport of these derivatives.

In addition to the fact that the lipoproteins protect the nucleotide derivatives from the action of nucleases, they also allow a targeted transport of these derivatives to target cells (particularly to the cells of certain tumors) on which a large number of receptors of these lipoproteins are expressed. Since they are not immunogenic and they are currently available in great variety on the market, the lipoproteins represent very advantageous transport vectors.

Other particularly preferred transport vectors of the invention are represented by polymer-based submicroscopic particles. For example, nanoparticles based on isobutylcyanoacrylate polymers (such as those described in European Patent No. 064967, filed on 04/23/1982), or microparticles made from copolymers of lactic acid and glycolic acid (G. SPENLEHAUER, M. VERT, J. P. BENOIT, F. CHABOT, and M. VEILLARD, *J. Control. Release* (1988), 7: 217-229) can be used for the intended application in the context of this invention.

/8

The term "nanoparticle" refers to any particle of the type mentioned above having an

average diameter of about 100 to about 500 nanometers. Preferably, the nanoparticles used in this invention have an average diameter on the order of 200 nanometers.

These nanoparticles present the advantage of protecting the nucleotide derivatives from the effects of nucleases from the body, and favor penetration of these nucleotide derivatives into the cells.

Particularly preferred compositions of the invention are those containing, as a transport vector, plasma proteins such as those mentioned above, these proteins being themselves encapsulated in polymer particles such as the nanoparticles defined above.

However, given their hydrophilic character and their charges, the preferred nucleotide derivatives of the invention cannot be associated as such with the essentially hydrophobic vectors used to make the compositions according to the invention.

This invention specifically provides charged, hydrophilic nucleotide derivatives, combined in a stable manner with hydrophobic transport vectors.

/9

Therefore, a particular object of the invention is compositions characterized in that they comprise compounds made up of mononucleotide, oligonucleotide, or polynucleotide derivatives of therapeutic and/or clinical interest, such as those mentioned above, these derivatives being hydrophilic, positively or negatively charged, modified or unmodified, and associated with hydrophobic derivatives having, if needed, a charge complementary to that of the above-mentioned nucleotide derivatives, the compounds being themselves associated with biocompatible transport vectors, particularly those made of polymer and/or protein as defined above.

The above-mentioned hydrophobic derivative is advantageously biocompatible and biodegradable.

Examples of uncharged hydrophobic derivatives that can be used in this invention are derivatives of porphyrin, daunomycin, lipids, etc.; said hydrophobic derivatives are linked to the nucleotide derivative by means of a covalent bond.

Particularly advantageous derivatives, especially when the nucleotide derivatives used are

charged, are present in ionic form (anionic or cationic) and have charges complementary to those of the derivatives to be associated with the transport vectors. These hydrophobic derivatives are capable of bonding on the one hand to the nucleotide derivatives by electrostatic interaction with the charge of the latter derivatives, and on the other hand with the hydrophobic regions of the vector by their hydrophobic part. /10

An example of the preferred hydrophobic ions of the invention are, in particular, the cations from salts having the general formula

//insert a, p. 10//

wherein:

- X represents a halogen, particularly an atom of chlorine or bromine,
- Y represents an atom of nitrogen or phosphorus,
- the groups R₁, R₂, R₃, and R₄, identical or different, represent a hydrogen atom or a hydroxyl function, or a halogen or an alkoyl or alkoxy group, linear or branched, having 1 to 25 carbon atoms, possibly substituted by one or more hydroxyl functions, or an aryl group particularly a phenyl or polyaromatic group, that may contain one or more heteroatoms such as N, S, P, Se, etc.,
- at least one of these groups: R₁, R₂, R₃, or R₄, represents an alkoyl or aryl group as defined above.

It is understood that the ammonium salts (in which Y represents a nitrogen atom) or phosphonium salts (in which Y represents a phosphorus atom) mentioned above are particularly appropriate for the preparation of compositions of the invention comprising negatively charged /11

nucleotide derivatives.

When the nucleotide derivatives are positively charged, the hydrophobic derivative used will be an anion, particularly the anion of sodium tetraphenylboride, having the formula

//insert//

Other particularly preferred hydrophobic derivatives of the invention are made up of fatty-chain amines carrying a positive charge, with a physiological pH, and whose hydrocarbon chains contain, in particular, 5 to 25 carbon atoms, such as stearylamine, sphingosine, or they are made up of lipids or phospholipids, and whose hydrocarbon chains contain, in particular, 10 to 25 carbon atoms also carrying a positive charge in their structure.

The combination of the nucleotide derivatives with a charged hydrophobic derivative as described above can be made advantageously simply by putting the hydrophobic derivative having a charge complementary to the charge of the nucleotide derivative into contact with said nucleotide derivative under conditions permitting the formation of an electrostatic bond between these two derivatives. /12

The latter solution represents a preferred variant of the process of preparing compositions of the invention. In fact, the establishment of a simple electrostatic bond between the hydrophobic derivative and the nucleotide derivative in no way changes the structural and functional properties of the latter, unlike a covalent bond, which may change the above-mentioned properties and consequently alter the therapeutic and/or diagnostic effects of said nucleoside or nucleotide derivatives.

Within this context of this preferred variant of the process of the invention, the stage of

contact of the nucleotide derivative with the hydrophobic derivative in ionic form is advantageously brought about so that the ratio:

$r = \text{charge of the hydrophobic derivative} / \text{charge of the nucleotide derivative}$

is between 1 and 200, preferably between 10 and 50.

Another object of the invention is a process for the preparation of these compositions, comprising primarily the following stages:

-if necessary, contact of the nucleotide derivative with a hydrophobic derivative, preferably charged, when said nucleotide derivative is hydrophilic and charged, under conditions such as those described above, permitting the formation of a bond between the two, with the understanding that the expression "bond" is used to describe the result of a mutual affinity, particularly a chemical one (for example, resulting from coupling) or a physical one (such as complexing, for example) or electrostatic affinity;

/13

-the incorporation of the compound made of the nucleotide derivative which is bound, if necessary, to the above-mentioned hydrophobic derivative, in the transport vector, by mutual mechanical interpenetration, particularly by encapsulation, or by adsorption of one into the other.

When a polymer transport vector is used, the compound made of the nucleotide derivative which is bound, if necessary, to the hydrophobic derivative, is encapsulated into this vector:

-by putting said compound in the presence of the monomer units of the vector, followed by a stage of polymerization of said vector, which then incorporates said compound;

-during polymerization, i.e., after the start of polymerization but before it is finished;

-or by putting said compound in the presence of the vector in polymerized form, as soon as it is possible to regulate the conditions of this proximity to allow for sufficient physical retention (or adsorption) of said compound on the polymer so that the compound which is adsorbed or retained on the polymer can reach the target cells along with the latter.

/14

Optimal conditions for encapsulation of said compound into submicroscopic particles,

particularly into nanoparticles of alkylcyanoacrylate such as nanoparticles of isobutylcyanoacrylate are described particularly in European Patent 064967, cited above, as well as in the detailed description to follow.

Thus, a specific object of the invention is a process for preparing a composition as described above, which includes the addition, under agitation, of the compound which is bound, if necessary to a hydrophobic derivative, to a solution containing a polymer of the type mentioned above, either in monomer form, during polymerization, or in polymerized form.

It can be further specified that, when the above-mentioned nanoparticles are used, the stage of encapsulation of said compounds will occur advantageously in a physiological solution with pH near 7, and at NaCl concentrations (0.15 M NaCl) close to physiological saline concentrations.

The adsorption of said compounds into the plasma proteins, particularly the lipoproteins, occurs advantageously under conditions similar to those described above.

Another object of the invention is a process of preparation comprising a phase of adsorption of said compounds (made up of nucleotide derivatives which are combined, if necessary, with a hydrophobic derivative), with plasma proteins, particularly lipoproteins, followed by a stage of encapsulation of the previously obtained complex in polymer particles, particularly in nanoparticles as defined above.

/15

Another object of the invention is pharmaceutical compounds containing at least one of the above-mentioned compositions in combination with a physiologically acceptable vehicle. These pharmaceutical compositions are intended particularly for the treatment of viral diseases (especially AIDS), bacterial diseases, parasite infestations, tumors, or all sorts of pathologies connected to a change in the genome of an individual.

Dosages and routes of administration of these compositions may vary depending on the type of infection to be treated.

Most generally, the pharmaceutical compositions of the invention are present in the form of injectable preparations in combination with a pharmaceutically acceptable liquid with a

physiological pH.

Another object of the invention is a method of cellular transfection which involves putting a composition according to the invention, comprising a specific nucleotide derivative, particularly one or more specific genes, into contact with cells to allow internalization of the above-mentioned nucleotide derivative into said cells.

More particularly, the invention concerns a method of transfection as defined above, in which said determined nucleotide derivative includes a nucleotide sequence coding for a determined polypeptide and, if necessary, regulation elements allowing for the expression of this fragment of nucleic acid in the host cell, particularly a promoter recognized by the polymerases of said host cell. The determined polypeptide is obtained by culturing the transformed host cells in an appropriate culture medium, followed by recovery of the specific polypeptide from these cells or from the culture medium.

/16

Thus, the object of the invention is a composition as described above in which the nucleotide associated with the transport vector and, if necessary, with a hydrophobic derivative, codes for a specific polypeptide.

In particular, the object of the invention is compositions of the type mentioned above in which the specific nucleotide derivative is inserted into the nucleotide sequence of a gene vector, particularly a plasmid, this plasmid being itself associated with an above-mentioned hydrophobic derivative, the whole made up of this plasmid associated with the hydrophobic derivative, which is itself associated with a transport vector as described above.

This nucleotide derivative included in this plasmid may also have a nucleotide structure such that it allows for blockage of the synthesis of a specific protein. In this case, such a composition is particularly advantageous, in combination with a physiologically acceptable vehicle, for the treatment of diseases connected with the synthesis of one or more specific undesirable proteins.

/17

Other characteristics of the invention are apparent from the following examples of compositions of the invention. These examples are non-limiting.

I – COMBINATION OF OLIGONUCLEOTIDES – NANOPARTICLES

Standard experiment:

In 1 mL of a polymerization medium containing 1% Dextran 70 and the necessary quantity of HCl for the pH of the medium to be 3, a quantity of 10 μ L of the monomer IsoButyl CyanoAcrylate (IBCA) is added with vigorous magnetic agitation to disperse the monomer. After 10 - 15 minutes, during which time the polymerization is apparent by opalescence of the medium, the ethanol solution is added (80 μ L to 200 μ L); it contains the complex between the mono- or oligonucleotide and the hydrophobic ion, studied in proportions defined by r, with r being equal to the ratio of the positive to negative charges of the oligonucleotide. The mixture is left in contact with the nanoparticles during the formation for 45 minutes with agitation. The medium is neutralized with 7 μ L of 1 M phosphate buffer adjusted to pH 7, then 30 μ L of 5 M NaCl is added to adjust the ion strength of the medium to 0.15 M NaCl. It is rotated for 30 minutes to balance the mixture, then the solution is centrifuged at 35,000 g [sic; rpm]. at 10°C. Since the oligonucleotide is tagged at one end by phosphorus 32, the radioactivity of the supernatant S and the residue C can be measured to determine the rate of encapsulation $\tau = 100 \cdot (C/C + S)$ /18

The hydrophobic ions used in the following tests are represented in Tables 1 – 3, as follows:

Table 1

Key:	1	Code
	2	Formula
	3	Compound
	4	Stearylamine (1-amino-octadecane)
	5	DL-Dihydro-sphingosine
	6	DL-1,3 dihydroxy-2-amino-octadecane

Table 2 /19

Key: 1 Compound
2 Tetramethylammonium chloride
3 Tetrabutylammonium chloride
4 Tetrahexylammonium chloride
5 Tetraoctylammonium chloride
6 Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Table 3 /20

Key:	1	Compound
	2	Tetramethylphosphonium chloride
	3	Tetrabutylphosphonium chloride
	4	Tetraphenylphosphonium chloride
	5	Hexadecyltributylphosphonium bromide (CTPB)

A) Encapsulation of adenosine triphosphate

/21

The tests of encapsulation of adenosine 5'-triphosphate (ATP) or dideoxyadenosine 5'-triphosphate (dd-ATP) in the presence of long-chain amines such as stearylamine or sphingosine has permitted significant encapsulation rates (Table 4). In these experiments, the marker used is the radioactive derivative tagged with the corresponding phosphorus-32.

Table 4

Key: 1 Experiment no.

(a) The concentration of XTP is kept constant and equal to 1.50×10^{-5} M in phosphate, and that of the cation at 3×10^{-3} M, hence $r = 200$.

B) Encapsulation of oligonucleotides

1. Octathymidylate: p(dT)

The concentration of p (dT)₈ is kept constant and equal to 1.5×10^{-5} M in phosphate or

1.9 μM in oligonucleotide. In the following experiments, the oligonucleotide is tagged with ^{32}P at end 5' and purified by polyacrylamide gel electrophoresis. The variations in the encapsulation rate of the cation P_3 (see Table 3) tagged with ^{14}C and of p(dT)_8 (tagged with ^{32}P) (double tagging method) as a function of the concentration of P_3 are presented in Figure 1. In this figure, the values of τ represent those values obtained without the addition of NaCl at the end of polymerization. The values of τ presented in the other tables and figures are obtained in the presence of the final 0.15 M NaCl . In Table 5, the results show that, in many cases, more than 90% of the oligonucleotide can be encapsulated, while avoiding the phenomenon of flocculation of the nanoparticles.

Table 5 /23

Key: 1 Experiment No:
 2 Tetraphenyl P (P3)
 3 f: Observation of aggregation of nanoparticles or flocculation at high ratios, r , of hydrophobic cation.

2. Hexadecathymidylates p(dT)₁₆

/24

In these experiments, the concentration of oligonucleotide is equal to $1.84 \mu\text{M}$ or 2.94×10^{-5} in phosphate. The results presented in Table 6 show that the cations having a long hydrocarbon chain make it possible to reach high encapsulation rate ($> 95\%$) for relatively low ratios r ($r = 20$). In addition, the use of low concentrations of cation allows for stable suspensions of nanoparticles except in the case of DOTMA. The change in the rate of encapsulation (τ) as a function of the ratio r (number of cations per phosphate) is presented in Figure 2 for the 3 cations A5, ST, and SP.

Table 6 /25

Key: 1 Experiment no:
2 Tetraoctyl N^+
3 a: N-[1(2,3,-diolyeyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
4 f: flocculation

3. Encapsulation, in the presence of sphingosine (SP), of some oligonucleotides of a known sequence, including one oligophosphorothioate

The results are indicated in Table 7.

The concentration of oligonucleotide used is 0.102 μM in oligonucleotide.

Table 7 /26

Key:	1	Experiment no:
	2	Cation
	3	a: oligophosphorothioate in which an atom of non-bridging oxygen is replaced by an atom of sulfur

These experiments show that, with identical sequence length, an oligophosphorothioate encapsulated better than the corresponding phosphodiester compound. By comparing experiments 26 and 22, we can see that the effectiveness of encapsulation is directly connected to the concentration of the cation-oligonucleotide complex present in the polymerization medium.

4) Direct encapsulation of some modified oligonucleotides

/27

In the following experiments, we indicate the results of direct encapsulation (absence of hydrophobic cations) of some oligonucleotides to which various chemical groups are attached covalently at the ends (see Table 8): hydrocarbon chain, insertion (derivatives of acridine), drug (daunomycin), photosensitizer (porphyrin). The structure of these compounds is shown in Figure 3. The presence of these groups may increase the hydrophobic nature of the hybrid molecule, as reflected in the rate of encapsulation in the nanoparticles, as well as in their ability to bond with lipoproteins (see below).

Key: 1 Experiment no.
2 Oligonucleotide (ON)

In experiments 29, 30, and 31, encapsulation is followed by fluorimetric measurements. It has been verified that the emission properties of the fluorophores were not affected by the presence of the polymer.

c) Encapsulation of polynucleotides

In the following examples, it is clear that the nanoparticles of poly(isobutylcyanoacrylate) can encapsulate single-strand polynucleotides whether they are made up of motifs in a ribo-(polyU) structure or desoxyribonucleotide structure such as poly(dT) (see Table 9). The example of the double-strand structures is illustrated by calf thymus DNA (not sonicated) (experiments 36 and 37).

Table 9 /30

Key: 1 Experiment no.

2 Tetraoctyl N⁺ polyU (A4)

The concentration of the polynucleotide is equal to 4×10^{-5} M in phosphate. These experiments show that it is possible to use these polymer vectors to encapsulate the messenger RNA's or DNA from higher organisms, of which one molecule may contain several billion pairs of bases.

II. Oligonucleotide - lipoprotein combination

The lipoproteins represented in this example by the low-density fraction, or LDL fraction, can fix oligonucleotides when the latter include a hydrophobic group such as porphyrin (Figure 4). The results show that one molecule of LDL, for example, can fix up to 17 molecules of an oligoheptathymidylate coupled with a porphyrin (T7-POR). In a control experiment under the same conditions, a non-coupled oligonucleotide (pdT16) is not encapsulated.

/30

The use of vectors such as LDL may make it possible to target the oligonucleotides toward certain types of tumor cells where the LDL receptors are expressed in larger numbers than the untransformed parent cells.

The legends of the figures mentioned above are as follows:

-Figure 1: encapsulation of P₃ (□) and of p(dT)₈ (o) as a function of the concentration of P₃. The concentration of oligonucleotides is kept constant and equal to 1.6×10^{-6} M in phosphate, and the concentration of the nanoparticles (N) is kept at 8 mg/mL. The pH of the polymerization medium is adjusted to 7 after 1 hour of polymerization by the addition of 7 µL of 1M sodium phosphate buffer. In this experiment, NaCl is not added at the end of polymerization.

-Figure 2: encapsulation of p(dT)₁₆ (2.94×10^{-5} M in phosphate) in the presence of sphingosine (◆), stearylamine (□) or CTAB (5) by nanoparticles of IBCA (10 mg/mL). The pH of the polymerization medium is adjusted to 7 then balanced with NaCl (0.15 M final) at the end of polymerization.

-Figure 4: curve of fixation of the oligonucleotide T7-POR on the LDL's (human plasma)

determined by measurement of the fluorescence of porphyrin at 626 nm. The concentration of oligonucleotide is equal to 3.5 μM . The stoichiometry of the complex is estimated at 17 molecules of oligonucleotide fixed per molecule of LDL.

Claims

1. Composition characterized in that it comprises compounds made up of nucleotide derivatives of therapeutic and/or clinical interest and which code, if necessary for a determined polypeptide, these derivatives being hydrophilic, positive or negatively charged, modified or unmodified, and associated with a hydrophobic derivative having, if necessary, a charge complementary to that of the above-mentioned nucleotide derivatives.

2. Composition according to Claim 1, characterized in that the nucleotide derivatives are made up of a nucleotide sequence inserted into the sequence of a vector, particularly a plasmid.

3. Composition according to Claim 1 or Claim 2, characterized in that the hydrophobic derivative is not charged, and is a porphyrin derivative or daunomycin.

4. Composition according to Claim 1 or Claim 2, characterized in that the hydrophobic derivative is charged and is present in cationic or anionic form.

5. Composition according to Claim 4, characterized in that the ratio

$$r = \text{charge of hydrophobic derivative} / \text{charge of nucleotide derivative}$$
is between 1 and 200, preferably between 10 and 50.

6. Composition according to Claim 4, characterized in that the hydrophobic derivative /33
corresponds to the cation from the compound with the general formula:

//Insert a, p. 33//

wherein:

-X represents a halogen, particularly a chlorine or bromine atom

-Y represents an atom of nitrogen or phosphorus

-the groups R₁, R₂, R₃, and R₄, identical or different, represent a hydrogen atom, or a hydroxyl function, or a halogen, or an alkyl or alkoxy group, linear or branched, having 1 to 25 carbon atoms, or an aryl group, particularly a phenyl group, or a polyaromatic that may contain one or more heteroatoms such as N, S, P, Se,

-at least one of these groups R₁, R₂, R₃, or R₄ represents an alkyl or aryl group as defined above.

7. Composition according to Claim 4, characterized in that the hydrophobic derivative corresponds to the anion from the sodium tetraphenylboride having the formula

//insert b, p. 33//.

8. Composition according to any of Claims 1 – 7, characterized in that the transport vectors are made up of polymer-based nanoparticles, particularly an alkylcyanoacrylate polymer, or a polymer based on lactic acid and glycolic acid.

/34

9. Composition according to any of Claims 1 – 8, characterized in that the transport vectors are made up of plasma proteins, particularly low-density lipoproteins (LDL).

10. Compositions according to any of Claims 1 – 9, characterized in that the transport vectors are made up of plasma proteins, particularly low-density lipoproteins, which are themselves encapsulated in nanoparticles as defined in Claim 8.

11. Pharmaceutical composition, characterized in that it includes a composition according to any of Claims 1 – 10 in combination with a physiologically acceptable vehicle.

12. Pharmaceutical composition according to Claim 11, characterized in that it is particularly appropriate for the treatment of diseases caused by viruses, bacteria, or parasites and

treatment of tumors.

13. Method of cellular transfection, characterized in that it involves putting a compound according to any of Claims 1 – 10 into contact with host cells, under conditions permitting internalization of the nucleotide derivative included in said composition within said host cells.

/35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 1

Key: 1 Incorporation of the np %
2 Initial concentration of p₃ μm

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 2

- Key:
- | | |
|---|---------------------------------------|
| 1 | Incorporation of the np % |
| 2 | Ratio of positive to negative charges |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 3

- Key: 1 Methylpyrroprophyrin
2 2-methoxy, 6-chloro, 9-amino acridine
3 Daunomycin

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 4